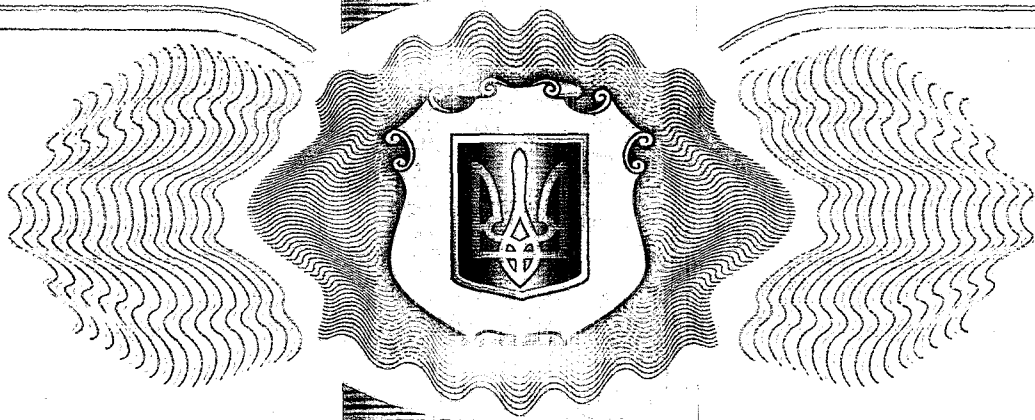


УКРАЇНА

UKRAINE



ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 85522

**N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІН ЯК ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ В
СУПРОВОДЖУЮЧІЙ ПРОТИПУХЛИННІЙ ТЕРАПІЇ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи
26.01.2009.

Голова Державного департаменту
інтелектуальної власності

М.В. Паладій





УКРАЇНА

(19) UA (11) 85522 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 31/164
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) N-СТЕАРОІЛЕТАНОЛАМІН ЯК ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ В СУПРОВОДЖУЮЧІЙ ПРОТИПУХЛИННІЙ ТЕРАПІЇ

1

2

(21) а200708176

(22) 18.07.2007

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ГУЛА НАДІЯ МАКСИМІВНА, UA, ХМЕЛЬ ТЕТЯНА ОЛЕКСІВНА, UA, КЛІМАШЕВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ МАР'ЯНОВИЧ, UA, БЕРДИШЕВ АНДРІЙ ГЕННАДІЙОВИЧ, UA, ГУДЗЬ ЄГОР АНАТОЛІЙОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA

(56) Gulaia N.M, Smirnov I.M, Shmal'ko I.P, Mel'nik A.A, Mel'nik S.N.: "Effect of N-palmitoyl- and N-stearoylethanolamines on lipid peroxidation in mouse

tissues in metastatic Lewis carcinoma", Ukr Biokhim Zh, 1993 Nov-Dec;65(6):96-101

Masotti L, Casali E, Gesmundo N.: "Influence of hydroxystearic acid on in vitro cell proliferation", Mol Aspects Med, 1993;14(3):209-15

(57) Застосування N-стеароїлетаноламіну як лікарського засобу, що має протипухлинні властивості, не змінює цитостатичну дію цисплатину, проявляє антитоксичну дію на організм, в супроводжувачій протипухлинній терапії перорально у вигляді твердих, рідких або м'яких лікарських форм для внутрішнього застосування у дозах 50мг/кг та 250мг/кг маси тіла.

Винахід відноситься до біології та медицини. N-стеароїлетаноламін (NSE) може бути застосований як лікарський засіб в супроводжувачій протипухлинній терапії для гальмування росту неоплазми і для корекції токсичних проявів протипухлинної терапії цитостатичними препаратами, а також для використання в схемах променевої терапії для людей і тварин.

Хіміотерапія злоякісних пухлин є важливим та необхідним засобом у схемі лікування онкологічних хворих. Цей метод застосовується як самостійно, так і в комбінації з хірургічним втручанням та променевою терапією.

Добре відомо, що лікування онкологічних захворювань за допомогою радіаційного випромінювання призводить до порушень процесів розвитку не тільки злоякісних клітин, а й негативно впливає на тканини і органи організму в цілому. До способу реабілітації організму після променевої терапії належать схеми застосування різних терапевтичних препаратів, що сприяють нормалізації процесів функціонування організму хворого.

В онкологічній практиці одним із найбільш ефективних цитостатичних препаратів є Цисплатин (Cisplatin) [1], комплексна сполука, що має в своєму складі платину. Цисплатин викликає зростання продукції реактивних форм кисню, що активують ядерний фактор Капа-β (NF-κappa β), що призводить до зростання експресії прозапальних медіаторів та інтенсифікації цитотоксичних ефектів Цисплатину. Цисплатин використовується для лікування багатьох злоякісних пухлин, здатний зв'язуватись з ДНК та інгібувати її реплікацію. Порушення функціонування нирок є основним фактором токсичності цього препарату. Тому в період лікування потрібно постійно спостерігати за функціонуванням нирок. Цисплатин застосовують в монотерапії або в комбінованій терапії з такими цитотоксичними препаратами: вінбластин, блеомицин, доксорубіцин, гексаметилмеламін, фторурацил, метотрексат, етопозид тощо, які належать до групи протипухлинних антибіотиків. Недоліком такої схеми лікування є те, що вищезазначені препарати можуть спричиняти порушення функцій

(13) C2

(11) 85522

(19) UA

печінки, нирок, серцево-судинної системи та підвищувати токсичний вплив препаратів платини.

Гідратація і використання Маннітола (2-6 годин внутрішньосудинне крапельне введення) підвищує діурез, що сприяє виводу води і гальмує реабсорбцію іонів натрію, хлоридів та прискорює виведення токсичних речовин. В процесі лікування Маннітолом необхідно контролювати ступінь гідратації та рівень натрію і калію в плазмі крові. До побічних ефектів дії цього препарату відносять гіпогідратацію, головний біль, набряк легенів, нудоту, блювання, діарею, тремор [1].

Враховуючи вищезазначене, необхідно підкреслити важливість застосування в лікуванні онкозахворювань супровідної терапії, що передбачає використання засобів, які гальмують пухлинний ріст та сприяють поліпшенню стану організму під дією токсичних речовин.

Широкий спектр біологічних ефектів N-ацилетаноламінів - природних біологічно активних ліпідних сполук, став основою до розробки нових лікувальних засобів, в яких ендоканабіноїди можуть бути використані як терапевтичні агенти за багатьох патологічних станів.

Відомо спосіб застосування сполук класу канабіноїдів, як антиоксидантів та нейропротекторів [2]. Відомий канабіноїд, Δ -9-тетрагідроканабінол - основна діюча речовина маріхуани, та основний ендоканабіноїд - N-арахідоноілетаноламін (2-(N-ейкоза-5,8,11,14-тетраєноіл)-аміноетанол), здатні викликати апоптоз клітин низки злоякісних пухлин (гліоми, раку шийки матки, раку простати, а також раків іншого походження) і є добрими об'єктами для дослідження їх протипухлинної дії з метою використання в клініці [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Однак N-арахідоноілетаноламін надзвичайно нестабільний, бо є похідною ненасиченої арахідонової кислоти з чотирма подвійними зв'язками і швидко окислюється як *in vivo*, так і *in vitro*. Крім того, обидві сполуки належать до психоактивних речовин, до яких легко виникає звикання. Намагаючись обійти ці складнощі, різні автори синтезують стійкі похідні ендоканабіноїдів, що не проявляють психоактивної дії [9].

Відомо, що ендоканабіноїдподібні речовини, що не мають психотропної дії, гальмують клітинний ріст *in vitro* [10]. До таких сполук належить NSE, гідроксиамід стеаринової кислоти (з довжиною насиченого вуглеводневого ланцюга C_{18}). NSE не зв'язується з канабіноїдними рецепторами, але проявляє канабіміметичні властивості.

NSE запропонований до застосування як лікарський засіб для фармакотерапії атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, стенокардії спокою та напруги, гострого коронарного синдрому, при функціональних та органічних ураженнях печінки та консервації донорських органів, опійній наркоманії, інтоксикаціях ЦНС, для лікування станів, що супроводжуються ішемією та гіпоксією органів та тканин, реперфузійним синдромом, оксидативним стресом, інтоксикаціями, наркотичною залежністю, запобігання розвитку незворотних структурних змін мембран, а також для істотного підвищення резистентності органів та тканин до дії ушкоджуючих чинників у людини та тварин [11].

Відомо, що NSE гальмує ріст та метастазування карциноми Льюїс у мишей за умов його введення на різних стадіях розвитку пухлини [12], порушує антиоксидантний захист клітин карциноми Льюїс. В той же час в умовно нормальній легеневій тканині пухлиноносіїв NSE гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів, сприяючи нормалізації в ній окисних процесів. Встановлено здатність NSE коригувати ліпідний склад умовно нормальній тканині легенів та змінювати ліпідну організацію злоякісних клітин за умов розвитку карциноми Льюїс у мишей [13].

Відомо, що для поліпшення стану організму за умов його інтоксикації широко використовується препарат Ербісол - комплекс природних органічних сполук негормонального походження, отриманих із тваринних ембріональних тканин, що застосовується внутрішньовенно. Як препарат супроводу при хімотерапії Ербісол підвищує ефективність лікування за двома напрямками: як гепатопротектор активує функції печінки, сприяючи прискоренню видалення із організму токсичних агентів [14], та як імунпротектор відновлює протипухлинний імунний статус [15]. Проте в деяких випадках в перші 2-5 діб лікування Ербісол може викликати загострення хронічних запальних процесів. Крім того, до недоліків препарату Ербісол слід віднести труднощі стандартизації препаратів із тваринних тканин, коштовність виробництва і висока споживча ціна препарату.

Задачею винаходу є пошук засобу, фізично та хімічно стійкого у зовнішньому та внутрішньому середовищі, здатного гальмувати розвиток неоплазми та коригувати порушення гомеостазу клітин і тканин пухлиноносія, зокрема стани, що супроводжуються накопиченням токсичних речовин в тканинах за умов введення цитотоксичних протипухлинних препаратів.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування NSE в супроводжуючій протипухлинній терапії з використанням Цисплатину.

NSE може бути використаний перорально у вигляді твердих, рідких та м'яких лікарських форм для внутрішнього вживання.

Вплив NSE на трансформовані клітини вивчали в досліджах *in vitro* на лейкомічних клітинах мишей L1210 за умов інкубації клітин з NSE в дозах 10^{-7} , 10^{-6} і 10^{-5} моль. Антипухлинна дія NSE спостерігається також за умов його введення перорально мишам з карциномою Льюїс. Введення препарату починали з 4 дня після перещеплення пухлини до кінця експерименту двічі на день по 50мг/кг та по 250мг/кг маси тварини, що складає, відповідно, 1мг та 5мг на мишу вагою 20г.

Приклад 1

Реалізація протипухлинного ефекту NSE.

Антипроліферативний ефект NSE спостерігається на лейкомічних клітинах мишей лінії L1210. На Фіг.1 показано, що за умов введення NSE у дозах 10^{-7} , 10^{-6} і 10^{-5} моль спостерігається дозозалежне гальмування проліферації клітин. Причому максимальний ефект виявляється через 24год після введення препарату до клітинного середовища.

Дані, представлені на Фіг.2, демонструють, що антипроліферативна дія NSE пов'язана з підвищенням кількості мертвих клітин лінії L1210. Вивчення клітин під дією NSE у дозах 10^{-7} , 10^{-6} і 10^{-5} моль вже через 24 години дозозалежно знижується порівняно з контрольними клітинами.

Таким чином, за умов введення NSE спостерігається зменшення проліферації досліджуваних

клітин лінії L1210 (Фіг.1), що може реалізуватися за рахунок цитотоксичного ефекту NSE на малігнізовані клітини (Фіг.2).

В таблиці 1 наведені дані щодо гальмування розвитку пухлини у тварин-пухлиноносіїв під дією NSE.

Таблиця 1

Діаметр пухлини та об'єм метастатичного ураження легенів у мишей з карциномою Льюїс за умов перорального введення NSE пухлиноносійам протягом 30 днів, порівняно з тваринами групи "Контроль", що не отримували препарат ($M \pm m$; $n=5-6$)

Параметр	"Контроль"	"NSE 1мг"	"NSE 5мг"
Діаметр пухлини, мм	30,6±0,5	22,4±0,6*	21,3±1,1*
Об'єм метастатичного ураження легенів, мм ³	38,3±3,9	31,9±6,1	25,6±3,1*

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою "Контроль"

Отримані результати можуть бути підґрунтям для використання NSE в лікуванні онкологічних захворювань.

Реалізація протекторної дії NSE на фоні токсичних проявів цитостатичної терапії Цисплатином ілюструється такими прикладами:

Приклад 2

Вплив NSE на ріст та метастазування карциноми Льюїс у мишей на фоні терапії Цисплатином.

Враховуючи здатність NSE гальмувати ріст пухлини і зважаючи на його мембранопротекторні, антиоксидантні та антизапальні властивості, спосіб використання NSE включає пероральне введення препарату за умов проведення протипухлинної терапії цитотоксичними препаратами: NSE

вводили перорально з 4 дня після перещеплення карциноми Льюїс до закінчення експерименту двічі на день у дозах 50мг/кг та 250мг/кг маси миші (1мг та 5мг на мишу, відповідно). Введення Цисплатину (0,1% водний розчин) починали з 10 дня після перещеплення по 0,2 мл внутріочеревенно через два дні до кінця експерименту.

В табл.2 представлені дані, що вказують на синергічну дію NSE до цитостатичного ефекту Цисплатину на ріст пухлини. Введення NSE гальмує ріст пухлини, зменшує кількість метастазів та знижує об'єм метастатичного ураження легенів на фоні терапії Цисплатином за рахунок зниження кількості метастазів великих розмірів.

Таблиця 2

Вплив NSE на ріст основного вузла та кількість метастазів у мишей з карциномою Льюїс на фоні терапії Цисплатином. $M \pm m$, $n=(5-6)$

Параметр	"Контроль"	"Цисплатин"	"Цисплатин + NSE 1мг"	"Цисплатин + NSE 5мг"
Діаметр пухлини, мм	30,6±0,5	22,6±0,8*	19,5±1,4*	20,0±1,1*
Кількість метастазів в легенях	22,4±6,6	10,6±2,2	11,1±1,6	10,9±1,9
Об'єм метастатичного ураження легенів, мм ³	38,3±3,9	27,5±2,1*	30,8±1,7	26,1±2,9*

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою "Контроль"

Отримані результати свідчать про те, що як лікувальний засіб в супроводжувачій протипухлинній терапії NSE не змінює цитостатичну дію Цисплатину, виражену в гальмуванні росту пухлини, і не погіршує ефект Цисплатину щодо зменшення кількості метастазів та об'єму метастатичного ураження легенів, що є важливим показником в розробці нових хіміотерапевтичних схем лікування.

Зважаючи на токсичний вплив Цисплатину на організм та посилюючись на мембранопротекторні та антиоксидантні властивості NSE, було досліджено вплив на організм засобу, що заявляється,

в супроводжувачій протипухлинній терапії Цисплатином.

Приклад 3

Вміст сечовини в плазмі крові мишей з карциномою Льюїс, що отримували NSE на фоні терапії Цисплатином.

Умови проведення дослідів такі, як описано в Прикладі 2. Токсичний вплив засобу, що заявляється, на організм, досліджували за рівнем сечовини в крові у тварин при проведенні супроводжувачій терапії Цисплатину з NSE. Одержано

неочікуваний результат зниження токсичності при комплексному лікуванні Цисплатином з NSE.

Як видно з Фіг.3 лікування мишей з карциною Льюїс Цисплатином призводить до збільшення вмісту сечовини в плазмі тварин, що вказує на рівень токсичних проявів Цисплатину і є важливим показником для контролю стану онкохворого. За умов введення NSE на фоні терапії Цисплатином рівень сечовини дозозалежно знижується, що демонструє антитоксичний ефект NSE.

Таким чином, виявлено виражені протипухлинні властивості лікарського препарату NSE для гальмування росту пухлини та процесів метастазування за умов розвитку неоплазми і проведення протипухлинної терапії цитотоксичними препаратами. Неочікуваним ефектом застосування NSE є зниження рівня токсичної дії Цисплатину на організм, що покращує загальний стан онкохворого. Проведені дослідження можуть служити обґрунтуванням для застосування NSE в медичній практиці як лікарського засобу в супроводжувачій протипухлинній терапії.

Джерела інформації, що взяті до уваги при складанні заявки:

1. Машковський М.Д. Лекарственные средства. М.: ООО "Издательство Новая волна", 2000. - 608с.

2. US 6,630,507, A, 07.10.2003.

3. Contassot E., Wilmotte R., Tenan M. et al. Arachidonylethanolamide induces apoptosis of human glioma cells through vanilloid receptor-1. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. - 2034. - 63. - P.956-963.

4. Contassot E., Tenan M, Schnuriger V. et al. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1 // Gynecol. Oncol. - 2004. - 93. - P.182-188.

5. Mimeault M., Pommery N., Watzet N. et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and

ceramide production // Prostate. - 2003. - 56. - P.1-12.

6. McKallip R.J., Lombard C, Fisher M. et al. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. // Blood. - 2002. - 100. - P.627-634.

7. Parolaro D., Massi P., Rubino T., Monti E. Endocannabinoids in the immune system and cancer // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. - 2002. - 66. - P.319-332.

8. Bifulco M., Laezza C, Valenti M. et al. A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation // FASEB J. - 2004. -18. - P.1606-1608.

9. Mavromoustakos T., Papahadjis D., Laggner P. Differential membrane fluidization by active and inactive cannabinoid analogues // Biochim Biophys Acta. 2001 Jun 6; 1512(2): 183-90.

10. WO 2004/069240 A2, 06.02.2004.

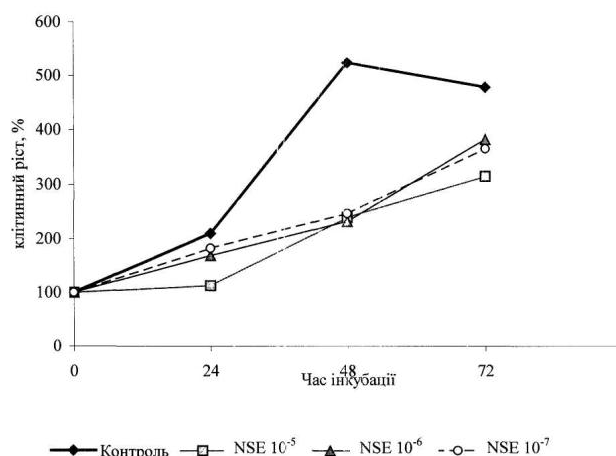
11. UA 77182, C2, 15.11.2006.

12. Гула Н.М., Хмель Т.О., Клімашевський В.М., Тодор І.М., N-стеароїлетаноламіну гальмує ріст та метастазування карциноми Льюїс та модулює ліпідний склад легенів за канцерогенезу у мишей. // Укр. Біохім. Журн. - 2006. - 78, №1. - С.135-142.

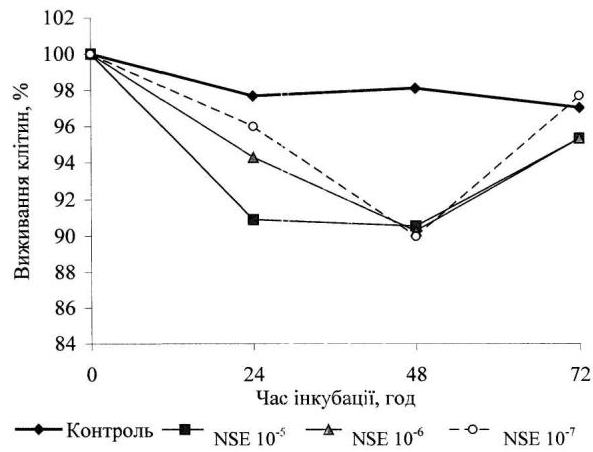
13. Гула Н.М., Хмель Т.О., Клімашевський В.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад метастазів та умовно нормальної тканини легенів у мишей з карциною Льюїс // Укр. Біохім. Журн. - 2006. - 78, №2 - С.97-105.

14. Бычкова Н.Г., Шипулин В.П., Фомина А.А., Бычкова С.А. Клинико-иммунологическая эффективность нового лекарственного препарата Ербиосола у пациентов с хроническими гепатитами. // Лік. справа. 1995. - (3-4). С.65-67.

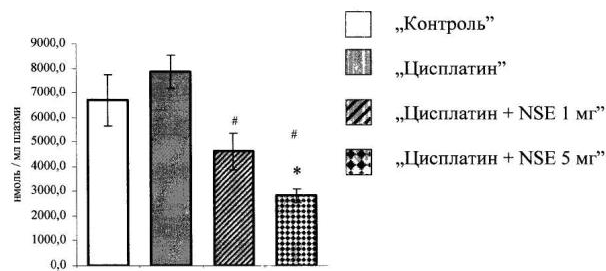
15. Шалимов С.А. и др. Эффективность использования низких доз иммуномодуляторов для лечения экспериментальных опухолей. // Клінічна хірургія. - 1999. - (6). - С.31-35.



Фіг.1. Вплив NSE на ріст лейкемічних клітин мишей лінії L1210 за умов введення різних доз препарату.



Фіг.2. Вплив різних доз NSE на співвідношення живих і мертвих клітин лінії L1210.



Фіг. 3. Вміст сечовини в плазмі крові мишей з карциномою Льюїс, що отримували NSE на фоні терапії Цисплатином.

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою „Контроль”

- дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою „Цисплатин”